

© Л. Р. Кутлыева,
И. Р. Гилязова, Р. И. Хусаинова,
Э. К. Хуснутдинова

Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Институт биохимии и генетики
Уфимского научного центра РАН

✿ Эпигенетические механизмы регуляции генов играют ключевую роль в канцерогенезе. Обзор посвящен анализу современного состояния исследований таких эпигенетических факторов, как модификация гистонов, геномный импринтинг, метилирование ДНК, ассоциированных с возникновением и прогрессированием рака почки.

✿ **Ключевые слова:** метилирование ДНК; модификации гистонов; рак почки; эпигенетические факторы; гены-супрессоры опухолевого роста.

РОЛЬ МОДИФИКАЦИИ ГИСТОНОВ И МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В РАЗВИТИИ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНЫХ КАРЦИНОМ

ВВЕДЕНИЕ

Рак почки (РП) — гетерогенная группа злокачественных опухолей, подавляющее большинство из которых представляют собой почечно-клеточные карциномы различных морфологических типов. Почечно-клеточные карциномы являются седьмой наиболее распространенной формой рака у женщин и пятой — у мужчин (Jemal et al., 2011). По статистическим данным, заболеваемость раком почки неуклонно растет (Sun et al., 2011). Ежегодно в мире регистрируют более 200 тысяч новых случаев РП. Среди опухолей мочеполовой системы РП занимает третье место, а по смертности находится на первом (Михайленко и др., 2007; Пальцев и др., 2009). Распространенность злокачественных опухолей почек в России составляет 7–8 человек на 100 тысяч населения в год (Пальцев и др., 2009). Прирост заболеваемости в течение последних 10 лет составил 53,66 %, уступив лишь новообразованиям предстательной и щитовидной желез (Курынин и др., 2008).

На гистологическом уровне выделяют несколько типов почечно-клеточной карциномы (ПКК): светлоклеточный — 60–85 %; папиллярный (хромофильный) — 7–14 %; хромофобный — 4–10 %; онкоцитарный — 2–5 %; рак собирательных протоков — 1–2 %. За этими гистологическими различиями стоят разные молекулярно-генетические нарушения, которые обуславливают возникновение и развитие опухоли, а также позволяют прогнозировать течение заболевания (Курынин и др., 2008; Lujiambio et al., 2008).

На протяжении многих десятилетий считалось, что основную роль в процессе инициализации канцерогенеза играют генетические нарушения (хромосомные aberrации, структурные нарушения ДНК), но исследования последних лет показывают, что нарушение эпигенетической регуляции ряда генов также вносит большой вклад в возникновение онкологических заболеваний. Следует отметить, что если значение хромосомных aberrаций в развитии онкологических заболеваний в настоящее время достаточно хорошо известно, то изучение эпигенетических механизмов — активно развивающаяся область научных исследований.

Понимание причин возникновения онкологических заболеваний и поиск методов их лечения будет способствовать формированию фундаментальных представлений о патогенезе данной группы заболеваний, позволит выявить эпигенетические факторы риска развития рака почки и разработать новые методы их эпигенетической терапии. Данная работа посвящена анализу современного состояния исследований роли таких эпигенетических факторов, как модификация гистонов, метилирование ДНК и геномный импринтинг в развитии почечно-клеточных карцином.

Роль модификации гистонов в эпигенетической регуляции.

Одним из эпигенетических механизмов, способных изменять структуру хроматина и его функции, а также контролировать такие процессы, как репликация ДНК, репарация и транскрипция является ковалентная модификация гистонов (Kurdistani, 2011; Sims et al., 2003). Наиболее частые модификации включают ацетилирование, метилирование или убиквитинирование лизина, метилирование аргинина, а также фосфорилирование серина (Bartova et al., 2008; Ruthenburg et al., 2007). Функциональные

Поступила в редакцию 27.03.2012
Принята к публикации 10.07.2012

последствия любой модификации зависят от ее типа и места, в котором изменение происходит (Stephens et al., 2012). Метилирование гистонов может происходить по лизинам и по аргининам. К каждому остатку лизина может присоединяться до трех метильных групп (Bannister et al., 2005), в результате чего лизин может быть монометилированным (me1), диметилированным (me2) или триметилированным (me3). Вариации статуса метилирования различных остатков лизина связаны с транскрипционной активностью (рис. 1). Например, триметилирование H3K27, H3K9 или H4K20 обычно приводит к инактивации гена, в то время как триметилирование H3K4, H3K36 или H3K79 приводит к увеличению транскрипционной активности (Martin et al., 2005; Larkin et al., 2012). Известно, что метилирование лизина в позициях 4 (H3K4) и 27 (H3K27) гистона H3 является ковалентной модификацией, чаще всего ассоциированной с развитием и прогрессированием опухоли (Chi et al., 2010).

Аргинины, в отличие от лизинов, могут быть только моно- (me1) и ди- (me2) метилированными. Метилирование аргинина осуществляется двумя белками — аргинин метилтрансферазами 1 и 6, которые добавляют метильные группы (CH₃) к аргинину, но при этом белок аргинин метилтрансфераза 6 действует как репрессор транскрипции, а аргинин метилтрансфераза 1 — как ее активатор (Di Lorenzo et al., 2011). Ацетилирование гистонов связано с добавлением ацильной группы (-COCH₃) к лизину ацетилтрансферазами, в то время как деацетилирование заключается в удалении ацильной группы деацетилазами. Ацетилирование лизина коррелирует с активацией транскрипции.

Метилирование гистонов регулируется действием белков с противоположными свойствами — метилтрансферазами и деметилазами, например, белки семейства гистоновых метилтрансфераз SET (SU (VAR)3–9, энхансер Zeste, Trithorax) и MLL (смешанное происхождение лейкозов) метилируют H3K4, тогда как деметилирование осуществляется лизин-специфичной гистоновой деметилазой 1 (LSD1), известной так же как KDM1A и JARID1 (Jumonji AT-богатый интерактивный домен 1, ныне известный как KDM5) (Klose et al., 2007; Ruthenburg et al., 2007).

Первые доказательства того, что гистоновые деметилазы вносят вклад в развитие онкологических заболеваний, были обнаружены в 2009 году van Naaften и его коллегами (van Naaften et al., 2009), которые описали инактивирующие мутации в гене *KDM6A*, расположенном на Xp11.2 и кодирующем H3K27-деметилазу, в 1,4 % образцов со светлоклеточным раком почки. Эти же мутации были обнаружены также в ряде других типов опухолей, в том числе при множественной миеломе (10,3 %) и плоскоклеточном раке пищевода (7,8 %). Исследование функциональных последствий выявленных мутаций в гене *KDM6A* свидетельствовало о важной роли его белка в регуляции транскрипции генов и в канцерогенезе.

В 2010 году Гербер Данс с соавт. (Duns et al., 2010) с помощью модифицированного метода «идентификации гена с помощью ингибирования нонсенс-опосредованной деградации мРНК (NMD)» обнаружили, что ген гистоновой метилтрансферазы SETD2/HYPB, расположенный на 3p21.31, является геном-супрессором опухолевого роста и вносит вклад в развитие ПКК путем триметилирования гистона H3K36.

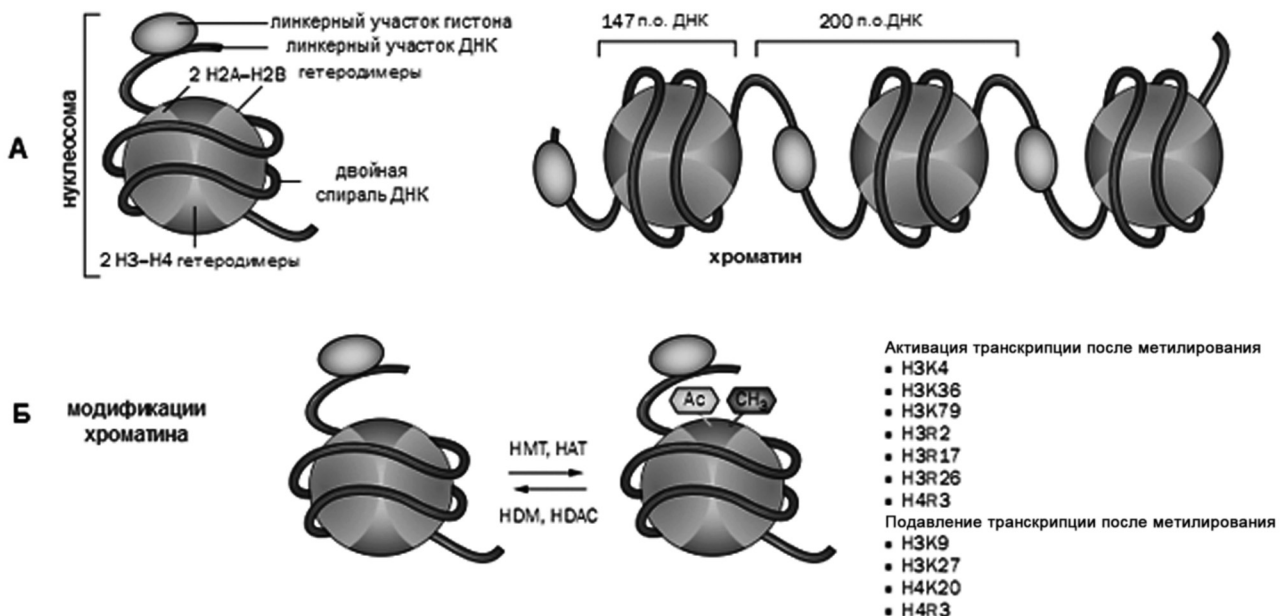


Рис. 1. а) структура хроматина; б) модификации гистонов могут быть представлены метилированием/ацетилированием лизина (K) или аргинина (R). Ацетилирование гистонов всегда приводит к активации транскрипции, а последствия статуса метилирования остатков лизина и аргинина на гистонах H3 и H4 могут быть различными (James Larkin et al., 2012)

В результате крупномасштабного исследования, включавшего секвенирование образцов ДНК, выделенных из опухолевой ткани светлоклеточных карцином, были выявлены две новые мутации: одна — в гене *SETD2*, кодирующем H3K36-метилтрансферазу, другая — в гене *KDM5C*, расположенном на хромосоме Xp11.22 и кодирующем H3K4-деметилазу, а также идентифицировано 5 генов, инактивация которых связана с развитием почечно-клеточных карцином — *SETD2*, *KDM5C*, *NF2*, *KDM6A* и *MLL2* (Dalglish et al., 2010).

Мутации, инактивирующие гены гистоновых деметилаз *KDM5C* и *KDM6A* при ПКК, в том числе вызывающие преждевременную остановку синтеза белка, могут приводить к устойчивому метилированию их мишеней (мометилирование H3K27, моно-, ди- или триметилирование H3K4), увеличивая транскрипционную активность (Martinez-Garcia et al., 2010). С другой стороны, мутации в генах гистоновых метилтрансфераз, таких как *SETD2* и *MLL2*, могут приводить к снижению метилирования H3K36/4, подавляя транскрипционную активность (Bannister et al., 2005), (рис. 2). Таким образом, эти изменения могут способствовать увеличению активности протоонкогенов и инактивации генов-супрессоров опухолевого роста, что дает возможность опухоли развиваться за счет сохранения ее агрессивных свойств и клеточной пролиферации (Huang et al., 2010).

Для анализа наличия модифицированных гистонов в конкретных регионах генов используют методы, основанные на иммунопреципитации хроматина (Park, 2009). Метод высокопроизводительной иммунопреципитации хроматина (ChIP) состоит в обработке живых клеток формальдегидом, которая вызывает образование ковалентных сшивок между ДНК и близкорасположенными участками белков. Затем хроматин дробится ультразвуком и с помощью иммунопреци-

питации со специфическими антителами выделяются районы ДНК, с которыми связываются интересные исследователя белки (Stephens, 2012). В настоящее время широкое распространение получили технологии ChIP-on-chip, когда преципитированные фрагменты ДНК для определения их расположения в геноме наносятся на микрочип и ChIPSeq, который представляет собой комбинацию метода иммунопреципитации хроматина с последующим секвенированием всего пула выделенных фрагментов (ChIP-Seq), который широко используется для получения картины полногеномного распределения сайтов связывания различных транскрипционных факторов.

МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК И КАНЦЕРОГЕНЕЗ

Метилирование ДНК происходит при помощи ферментов ДНК-метилтрансфераз (DNMT). Наиболее изученным на сегодня ферментом системы метилирования ДНК у позвоночных является ДНК-метилтрансфераза 1 (DNMT1), которая поддерживает метилированное состояние ДНК, присоединяя метильные группы к одной из цепей ДНК в точках, где другая, комплементарная ей цепь, метилирована. ДНК-метилтрансфераза 3 семейства DNMT3 (DNMT3A и DNMT3B), экспрессия которой координируется белком DNMT3L (Gowher et al., 2005), лимфоидспецифичной геликазой Lsh (Zhu et al., 2006), микро-РНК (Fabbri et al., 2007) и pi-РНК (Aravin et al., 2008), осуществляет метилирование *de novo*, а функции ДНК-метилтрансферазы 2 до сих пор до конца не изучены. Считается, что DNMT2 имеет РНК-метилязную активность и может метилировать цитозин в 38 положении антикодоновой петли тРНК аспарагина (Goll et al., 2005). Выяснено, что во время репликации ДНК метилирование сохраняется комплексом взаимодействующих метилтрансфераз или возникает *de novo* с помощью

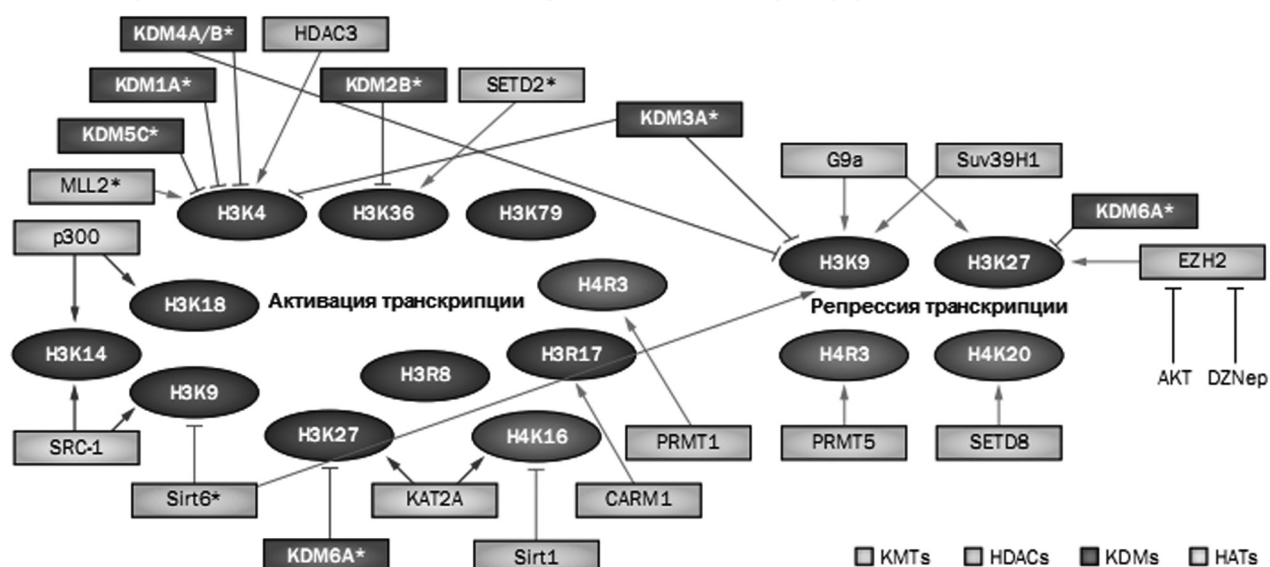


Рис. 2. Карта метилирования и ацетилирования гистонов при почечно-клеточных карциномах. Регуляторы, в которых, по литературным данным, были обнаружены мутации, обозначены звездочками* (James Larkin et al., 2012)

метилтрансфераз DNMT3A и DNMT3B (El-Osta, 2003), метилмодифицирующих гистонов (Kim et al., 2009) и убиквитин-подобных белков, содержащих полипептид, ассоциированный с анемией Фанкони (PHD) и RING-finger доменом 1 (Agita et al., 2008).

Основными мишенями метилирования в цепях ДНК являются CpG-динуклеотиды, метилирование вне которых встречается лишь в эмбриональных стволовых клетках (Ramsahoye et al., 2000). Значительная часть тканеспецифичных генов имеет одиночные CpG-динуклеотиды в промоторных участках. Около 70–90 % CpG-динуклеотидов в геноме млекопитающих метилировано, степень их метилирования может быть различной в разных клетках и тканях, но существуют последовательности, где CpG-динуклеотиды распределены кластерами. Такие последовательности получили название CpG-островков. Они часто располагаются в 5'-регуляторных районах генов, но также встречаются в интронах и на 3'-концах генов (Saxonov et al., 2006). Более половины генов, включая протоонкогены и гены-супрессоры опухолевого роста, содержат CpG-островки (Лихтенштейн с соавт., 2001). В нормальных соматических клетках большинство CpG-островков не метилированы. Аберрантное метилирование CpG-островка какого-либо гена-супрессора опухолевого роста может приводить к потере его экспрессии, способствуя инициации и прогрессии опухоли. Причина аберрантного метилирования до сих пор остается неизвестной. Оно может быть вызвано воздействием метилтрансфераз или других хроматин-связывающих белков (Poke et al., 2010). К настоящему времени обнаружено и идентифицировано большое количество метилированных генов, которые связаны с возникновением онкологических заболеваний.

Метилирование может быть сниженным (гипометилирование) и повышенным (гиперметилирование), глобальным (тотальным) и локальным. Локальное гиперметилирование, распространяющееся на небольшую часть CpG-динуклеотидов, которые входят в состав CpG-островков, приводит к инактивации генов-супрессоров опухолевого роста (Cheung et al., 2009). Глобальное гипометилирование в повторяющейся последовательности ДНК дестабилизирует хромосомы и увеличивает скорость геномных перестроек. Потеря глобального (тотального) метилирования генома стала первым эпигенетическим изменением, обнаруженным более 25 лет назад (Gama-Sosa et al., 1983; Suzuki et al., 2006) и продолжает оставаться одним из наиболее распространенных молекулярных изменений в наши дни, наблюдаемых при раке толстой кишки, желудка, легких, печени, молочной железы, мочевого пузыря, яичников и эндометрия. Кроме того, зачастую существует ассоциация между стадией заболевания и степенью гипометилирования ДНК, что позволяет использовать последнюю в качестве диагностического маркера, а также прогнозировать течение заболевания.

Первоначально уменьшение степени метилирования ДНК было недостаточным основанием для того, чтобы определенно говорить о роли метилирования ДНК в онкогенезе, т. к. данный процесс мог быть вторичным, но в настоящее время результаты многочисленных исследований доказали, что, во-первых, часто потеря метилирования ДНК происходит во время стадии предрака или во время пренеопластической стадии канцерогенеза (Nakagawa et al., 2005). Во-вторых, уровень гипометилирования ДНК в опухолях выше, чем в пренеопластических тканях и, в-третьих, во время прогрессирования заболевания от нормального состояния до IV стадии опухоли при различных видах рака, происходит накопление изменений метилирования. Все это дает основание полагать, что потеря метилирования ДНК при онкологических заболеваниях является не следствием трансформации опухоли, а играет ключевую роль в манифестации заболевания. Широкомасштабное исследование, проведенное в испанской популяции, показало, что существует ассоциация между гипометилированием ДНК и повышенным риском развития рака мочевого пузыря (Moore et al., 2008). Кроме того, обнаружено, что снижение метилирования генов (цитозин-5-)-метилтрансферазы 1 (*DNMT1*) (Yamada et al., 2005) и семейства транспортеров органических катионов 11 (*SLC11A1 (LSH)*) (Fan et al., 2008) приводит к возникновению опухоли, что также является доказательством первостепенной роли гипометилирования ДНК в онкологии.

Поскольку геном млекопитающих состоит из относительно коротких неметилированных доменов, встроенных в матрикс длинных, устойчиво метилированных, то потеря метилирования происходит именно в этих областях генома. Так, деметилирование повторяющихся последовательностей, расположенных в центромерном, перичентромерном и субтеломерном хромосомных регионах, может быть причиной хромосомных аномалий. По данным Боузинба-Сегарда с соавт. (Bouzinba-Segard et al., 2006), гипометилирование ДНК в центромерном регионе приводит к транскрипционной активности в центромере и последующей аккумуляции небольших сателлитных транскриптов, нарушающих строение центромеры и ее функции. Гипометилирование субтеломерных регионов ассоциировано с усиленной транскрипцией теломерного региона (Yehezkel et al., 2008). Кроме того, в результате гипометилирования LINE-1, SINE, Alu и IAP мобильных элементов может происходить их перемещение, приводя к геномной нестабильности.

Известно, что при злокачественных новообразованиях происходит гипометилирование некоторых онкогенов. Фактор транскрипции с-Мус, который действует как онкоген, является одним из хорошо изученных гипометилированных генов при онкологических заболеваниях. Гипометилирование с-Мус впервые обнаружено в клеточных линиях, а позже идентифицировано при таких опухолях, как гепатоцеллюлярная карцинома, лейкемия и рак желудка.

Также известно, что его метилирование связано с прогрессией рака мочевого пузыря и колоректального рака (Cheung et al., 2009). Гипометилирование Р-кадгерина (*CDH3*) было обнаружено при раке толстой кишки (Milicic et al., 2008) и молочной железы (Paredes et al., 2005). Гипометилирование ДНК в онкогене синуклеина С (*SNCG*) приводит к развитию рака молочной железы и яичников (Gupta et al., 2003), желудка (Yanagawa et al., 2004), печени (Zhao et al., 2006).

Кроме того, показано, что многие другие гены оказались также гипометилированы при онкологических заболеваниях. К их числу относятся гены белка, богатого цистеином 1 (*CRIP1*), S100 кальций-связывающего белка Р (*S100P*), гипометилирование которых обнаружено при раке предстательной железы (Wang et al., 2007), ген трансмембранного белка L1 молекулы клеточной адгезии (*L1CAM*), гипометилированный при колоректальном раке (Kato et al., 2009) и ген семейства Х антигена (*XAGE-1*), метилирование которого снижено при раке желудка (Lim et al., 2005). Одной из модельных систем для изучения нарушения статуса метилирования ДНК является геномный импринтинг, который дифференциально маркирует некоторые локусы гомологичных хромосом и «выключает» экспрессию одного аллеля. Таким образом, в участках генома, подверженных импринтингу, обнаруживается не биаллельная, а моноаллельная экспрессия генов, причем, если импринтирован материнский ген, то экспрессируется отцовский аллель, и наоборот (Reik et al., 2001). В основе геномного импринтинга лежат специфические структурно-молекулярные изменения отдельных участков хромосом, происходящие во время формирования мужских и женских половых клеток, которые приводят к стойким функциональным различиям экспрессии гомологичных генов у потомства.

Следует отметить, что за последнее время произошел большой прогресс в идентификации импринтированных генов. У человека известно уже более 70 таких генов и транскриптов (<http://igc.otago.ac.nz/1101Summarytable.pdf>). Импринтированные гены обнаружены на многих хромосомах человека (Назаренко с соавт., 2002). Молекулярной основой поддержания моноаллельной экспрессии генов является в основном дифференциальное метилирование промоторных регионов импринтированных локусов или регуляторных последовательностей, так называемых центров импринтинга, на разных родительских копиях хромосом. Для метилированного аллеля импринтированного гена характерно отсутствие экспрессии, тогда как неметилированные аллели являются функционально активными (Лебедев с соавт., 2008). Особое внимание уделяется явлению потери импринтинга в эпигенетике рака почки. Существует ряд работ, в которых данный феномен был зарегистрирован на уровне экспрессии, но статус метилирования при этом не изучался. Так, в работе Нономура с соавт. (Nonomura

et al., 1997) исследована аллель-специфическая экспрессия гена инсулиноподобного фактора роста (*IGF2*). Ген *IGF2* — это импринтированный ген, транскрибируемый в норме только с отцовской хромосомы. В исследовании было включено 22 больных ПКК, 16 из которых (72 %) были информативными. Все больные ПКК с потерей импринтинга гена *IGF2* имели начальную стадию развития опухоли. Установлено, что при начальной стадии опухоли потеря импринтинга гена *IGF2* при ПКК не была ассоциирована с гиперэкспрессией *IGF2* мРНК, тогда как повышенная экспрессия этого гена часто наблюдалась на прогрессирующей стадии развития заболевания. Данные результаты позволяют предполагать, что потеря импринтинга гена *IGF2* предрасполагает к медленному прогрессированию опухоли, тогда как его повышенная экспрессия, возможно, способствует более быстрому росту опухоли. Известно также, что гипометилирование явилось причиной потери импринтинга данного гена при колоректальном раке, раке молочной железы (Ito et al., 2008), печени (Tang et al., 2006) и мочевого пузыря (Takai et al., 2001), гена *H19* — при раке толстой кишки (Ito et al., 2008), легких (Kondo et al., 1995) и гена *KCNQ1* — при раке молочной железы, печени и толстой кишки (Scelfo et al., 2002).

Известно, что более 70 % генов в геноме человека в норме содержат неметилированные CpG-островки в промоторах (Saxopov et al., 2006), хотя последнее исследование 5549 аутомомных генов с множеством CpG-островков показало, что около 4 % этих генов метилированы и инактивированы при нормальных условиях.

Таким образом, если ранее большинство исследователей отмечали значимую роль гиперметилирования промоторов и подавление экспрессии генов при онкологических заболеваниях и недостаточно внимания уделялось пониженному уровню метилирования генов в нормальной ткани, то в настоящее время установлено, что гипометилирование некоторых генов также играет существенную роль в канцерогенезе.

Гиперметилирование при онкологических заболеваниях происходит чаще, чем гипометилирование. Статус метилирования CpG-островка играет важную роль в регуляции транскрипции генов. В обычных соматических клетках многие CpG-островки не метилированы, но метилированные CpG-островки обнаруживают практически при всех типах первичных опухолей. Механизм гиперметилирования при онкологических заболеваниях полностью не изучен. Несколько исследований показали, что он может быть связан с взаимодействием *de novo* метилтрансфераз DNMT1 и других ДНК — связывающих белков. Например, DNMT1 образует комплекс с белком Rb — опухолевым репрессором, который контролирует G—S переход путем соединения с E2F транскрипционными факторами, гистоновой деацетилазой 1 (HDAC1) для подавления транскрипции в промоторах, содержащих E2F-сайты связы-

вания в опухолевых клетках (Robertson et al., 2000). Кроме того, DNMT1 взаимодействует с белком p53 и фосфатазой Cdc25C (Esteve et al., 2005).

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что гиперметилирование ДНК может происходить во многих генах, участвующих в различных биохимических путях, которые имеют отношение к развитию опухоли и ее прогрессии. В их числе гены клеточного цикла (*CDKN2A/p16-INK4*, *CDKN2B/p15-INK4B*, *CCND2*, *RB1*), репарации ДНК (*MGMT*, *BRCA1*, *MLH1*), апоптоза (*DAPK*, *TMS1*, *TP73*), метастазирования (*CDH1*, *CDH13*, *PCDH10*), детоксикации (*GSTP1*), RAS- (*RASSF1*) и Wnt-сигнального пути (*APC*, *DKK1*). Гиперметилирование некоторых генов, таких как циклин зависимые киназы (*CDKN2A/p16-INK4*), гены семейства Ras (*RASSF1*), метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (*MGMT*) часто наблюдается при нескольких видах опухоли, в то время как другие связаны только с определенным типом опухолей. Например, при глиоме гиперметилированы X-сцепленные, экспрессируемые в мозге гены 1 и 2 (*BEX1* и *BEX2*) (Foltz et al., 2006), а при остром лейкозе — ген протеинфосфатазы 1 подгруппы 13В (*PPP1R13B*) (Roman-Gomez et al., 2005). Некоторые виды рака являются более уязвимыми к эпигенетическим сбоям. В соответствии с базой данных PubMeth (<http://www.pubmeth.org/>), чаще всего гиперметилирование ДНК ассоциировано с раком легких, желудка, толстой кишки, головного мозга, печени, почки, молочной и предстательной желез (Ongenaert et al., 2008).

Важнейшими задачами эпигеномики в онкологии являются масштабная характеристика особенностей метилирования ДНК, отличающих геномы опухолевых клеток от нормальных и разработка высокотехнологичных платформ для масштабного же анализа метилирования в диагностических и научных целях (Стрельников и др., 2010). К настоящему времени разработано множество методов, позволяющих оценивать метилирование как тотальной ДНК, так и отдельных ее участков. Наиболее часто используется два подхода — методы, основанные на бисульфитной конвертации ДНК (метилспецифическая ПЦР, бисульфитное секвенирование, комбинированный бисульфитно-рестрикционный анализ (COBRA)) и методы, основанные на расщеплении ДНК эндонуклеазами рестрикции, обладающие различной чувствительностью к метилированным последовательностям (метилчувствительная ПЦР, метилсвязанная ПЦР). Каждый метод имеет свои достоинства и недостатки, и выбор конкретного метода зависит от задач исследования. Рассмотрим лишь некоторые из них. Наиболее простым, но недостаточно информативным методом определения метилирования является метилчувствительная ПЦР (МЧ-ПЦР), которая основана на применении ферментов рестрикции, активных только в отношении метилированной или только неметилированной ДНК. Анализируемая ДНК обрабатывается рестриктазами, в сайты рестрикции которых входят

СрG-динуклеотиды, после чего проводят ПЦР интересующего региона. В случае расщепления ДНК в области исследуемой СрG-пары, амплификация не происходит. Данный метод позволяет определять метилирование нуклеотидной последовательности, содержащей небольшое количество СрG-динуклеотидов и только при удачно подобранных рестриктазах (Смирнихина и др., 2009). Одним из наиболее точных и эффективных методов определения метилирования всех СрG-динуклеотидов анализируемой области является бисульфитное секвенирование, при подготовке к которому геномную ДНК обрабатывают бисульфитом натрия, который вызывает переход неметилированных остатков цитозина в урацил, но не изменяет метилированные цитозины. В результате такой модификации ДНК становятся некомплементарными. Амплификация исследуемой последовательности с помощью ПЦР и последующее прямое секвенирование выявляют только те цитозиновые остатки, которые в исходной цели были метилированы. Метил-специфическая ПЦР (МС-ПЦР) также основана на обработке исследуемых ДНК бисульфитом натрия и позволяет оценивать статус метилирования группы близкорасположенных СрG-динуклеотидов в составе СрG-островка. Для амплификации модифицированной ДНК конструируют праймеры, которые избирательно амплифицируют последовательности, содержащие метилированные или неметилированные остатки цитозина. По тому, с какой парой праймеров проходит ПЦР, можно судить о метилировании. Данный метод часто сочетают с ПЦР в реальном времени, что увеличивает чувствительность и специфичность метилирования СрG-динуклеотидов.

В настоящее время широко используется метод полногеномной оценки метилирования СрG-динуклеотидов с использованием микрочипов, который позволяет идентифицировать наиболее перспективные маркеры для диагностики того или иного заболевания.

Значительные изменения частоты метилирования для определенных генов-супрессоров опухолевого роста наблюдаются при различных видах рака, но для выявления частоты аномального метилирования с высокой достоверностью необходимо не только выбрать адекватный метод анализа, но и сформировать большие выборки пациентов.

РОЛЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ПРИ РАКЕ ПОЧКИ

В настоящее время накоплены обширные данные о генах, которые инактивируются в результате метилирования их регуляторных районов при ПКК (табл. 1). Промоторное гиперметилирование и подавление экспрессии генов являются частыми причинами инактивации генов-супрессоров опухолевого роста при многих видах опухоли почки (Morris et al., 2010). Так, при светлоклеточной ПКК часто выявляется инактивация гена-супрессора фон Хипеля-Линдау (*VHL*), локализованного в области 3 p25.

Таблица 1

Гены, наиболее часто метилируемые при почечно-клеточной карциноме

Краткое название гена	Полное название гена	Локализация	Кодируемый белок и его основные функции	Частота метилирования	Ссылка и примечание
<i>ABCG2</i>	Ген АТФ-связывающего кассетного транспортера G2 (ATP-binding cassette, sub-family G member 2)	4q22.1	АТФ-связывающий кассетный транспортер G2 является мембранным транспортером ксенобиотиков и играет важную роль в лекарственной резистентности опухолевых клеток	56%	То К. К., 2006; метилирование гена обнаружено при светлоклеточной ПКК
<i>APC</i>	Ген аденоматозного полипоза кишечника (adenomatosis polyposis coli)	5q21-q22	Белок аденоматозного полипоза кишечника является супрессором опухолевого роста, участвует в Wnt-сигнальном пути в качестве негативного регулятора, а также играет важную роль в факторе роста гепатоцитов (HGF)	19-23%	Costa V., 2007; метилирование гена обнаружено при светлоклеточной и папиллярной ПКК
<i>ARH1</i>	Ген АДФ-рибозиларгининовой гидролазы (ADP-ribosylarginine hydrolase)	1p31	АДФ-рибозиларгининовая гидролаза катализирует обратную реакцию моно-АДФ-рибозилирования	100%	Costa V., 2007; метилирование гена обнаружено при светлоклеточной ПКК, а также в нормальной почечной паренхиме
<i>CDH1</i>	Ген E-кадгерина (E-cadherin)	16q22.1	E-кадгерин является кальций-зависимым белком клеточной адгезии, способствует дифференцировке клеток	16-83%	Ellinger J., 2010; метилирование гена обнаружено при светлоклеточной ПКК
<i>CDKN2A (p16INK4a)</i>	Ген ингибитора циклин-зависимой киназы (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)	9p21	Белок p16 действует как негативный регулятор пролиферации нормальных клеток, является регулятором клеточного цикла	23%	Vidaurreta M., 2008; Метилирование гена обнаружено только в опухолевых клетках
<i>COL1A2</i>	Ген альфа 2 цепи коллагена I-го типа (collagen type I, alpha 2)	7q21.3	Белок альфа-2 цепи коллагена I-го типа выполняет соединительную функцию	24%	Ricketts C. J., 2012; метилирование гена обнаружено только в опухолевых образцах
<i>COL14A1</i>	Ген альфа 1 цепи коллагена 14-го типа (collagen type XIV, alpha 1)	8q23	Белок альфа-1 цепи коллагена 14-го типа, выполняет соединительную функцию между коллагеновыми пучками	44%	Morris M., 2010; метилирование гена обнаружено при светлоклеточной ПКК
<i>CST6</i>	Ген цистатина E/M (cystatin E/M)	11q13	Цистатин E/M является супрессором опухолевого роста, ингибирует сериновые протеазы (капсепин B), служит мишенью для перекрестной связи с трансглутаминазой	46%	Morris M., 2003; метилирование гена обнаружено при светлоклеточной ПКК
<i>FHIT</i>	Ген ломкой гистидиновой триады (fragile histidine triad)	3p14.2	Белок-AP3A-гидролаза относится к супрессорам опухолевого роста, влияет на интенсивность репликации ДНК	50-60%	Costa V., 2007; метилирование гена обнаружено только в опухолевых клетках
<i>FOXL1</i>	Ген семейства FOX (forkhead box L1)	16q24	Белок FOXL1 является транскрипционным фактором	37%	Ricketts C. J., 2012; метилирование гена обнаружено в нормальных и опухолевых образцах
<i>GATA5</i>	Ген транскрипционного фактора GATA-5 (GATA-binding factor 5)	20q13.33	Транскрипционный фактор GATA-5 участвует в регуляции гепатоспецифических ядерных факторов	28%	Peters I., 2012; метилирование гена обнаружено при метастатической ПКК

Краткое название гена	Полное название гена	Локализация	Кодируемый белок и его основные функции	Частота метилирования	Ссылка и примечание
<i>LRRC3B</i>	Ген, кодирующий белок, богатый лейциновыми повторами (leucine rich repeat containing 3B)	3p24	Белок, богатый лейциновыми повторами участвует во взаимодействии гормональных рецепторов, адгезии клеток, развитии нервной системы (особенно миграции нейронных клеток), поляризации клеток и апоптозе	35 %	Koprdratov A. G., 2012; метилирование гена обнаружено при светлоклеточной ПМК
<i>MSH2</i>	Ген гомолога MutS2 (mutS homolog 2)	2p21	Гомолог MutS2 относится к супрессорам опухолевого роста и участвует в процессах репарации	55 %	Yoo K. H., 2010; метилирование гена обнаружено при светлоклеточной ПМК
<i>NOTCH3</i>	Ген семейства NOTCH (notch homolog 3)	19p13.2–p13.1	NOTCH функционирует как рецептор мембранных лигандов, вовлечен в дифференцировку, пролиферацию клеток и апоптоз	29 %	Rickelts C. J., 2012
<i>PDLIM4</i>	Ген PDZ и LIM-домена белка 4 (and LIM domain 4)	5q31.1	PDZ-LIM доменный белок модулирует работу нитей актина, участвует в процессах клеточного роста и апоптозе	43 %	Morris M., 2010; метилирование гена обнаружено при светлоклеточной ПМК
<i>SFN</i>	Ген стратифина (stratifin)	1p36.11	Стратифин вовлечен во многие сигнальные пути; при связывании с KRT17 регулирует рост эпителиальных клеток через Akt/MTOR — сигнальный путь	100 %	Costa V., 2007; метилирование гена обнаружено при светлоклеточной и папиллярной ПМК, а также в нормальных тканях почечной паренхимы
<i>TRIM58</i>	Ген, кодирующий трехсторонний мотив-содержащий белок 58 (tripartite motif-containing 58)	1q44	Трехсторонний мотив-содержащий белок 58 индуцирует интерфероны, участвует в транскрипции	33 %	Rickelts C. J., 2012
<i>UTF1</i>	Ген транскрипционного фактора недифференцированной эмбриональной клетки (undifferentiated embryonic cell transcription factor 1)	10q26	Транскрипционный фактор недифференцированной эмбриональной клетки действует как транскрипционный коактиватор ATF2	33 %	Rickelts C. J., 2012
<i>ZNF177</i>	Ген, кодирующий белок «цинковых пальцев» (zinc finger protein 177)	19p13.2	Белок «цинковых пальцев» участвует в транскрипции	29 %	Rickelts C. J., 2012
Диагностические и прогностические маркеры почечно-клеточной карциномы					
<i>APAF-1</i>	Ген активирующего фактора апоптозной пептидазы (apoptotic protease activating factor 1)	12q23	Активирующий фактор апоптозной пептидазы индуцирует процессы апоптоза	97 %	Christoph F., 2006; Ahmad S.T., 2011 метилирование гена обнаружено при агрессивном развитии ПМК
<i>ATP5G2</i>	Ген АТФ синтазы, транспортирующей митохондриальный комплекс (ATP synthase lipid-binding protein)	12q13.13	Белок — митохондриальная АТФ-синтаза осуществляет синтез АТФ с помощью транспорта протонов во время окислительного фосфорилирования	36 %	Morris M., 2011; метилирование гена обнаружено только в опухолевых образцах
<i>CCDC8</i>	Ген, содержащий двухспиральный домен 8 (coiled-coil domain containing 8)	19q13.33	Белок, содержащий двухспиральный домен 8 выступает в качестве кофактора, необходимого для p53-опосредованного апоптоза после повреждения ДНК	35 %	Morris M., 2011; метилирование гена обнаружено только в опухолевых образцах

Таблица 1 (продолжение)

Краткое название гена	Полное название гена	Локализация	Кодируемый белок и его основные функции	Частота метилирования	Ссылка и примечание
<i>CORO6</i>	Ген коронина 6 (coronin 6)	17q11.2	Коронин 6 является актин-связанным белком и взаимодействует с микротрубочками	22%	Morris M., 2011; метилирование гена обнаружено только в опухолевых образцах
<i>DAPK-1</i>	Ген проапоптотической протеинкиназы-1 (death-associated protein kinase 1)	9q34.1	Кальций-зависимая серин/треонин-специфическая киназа является супрессором опухолевого роста, участвует в фосфилировании, регулирует апоптоз	41%	Christoph F., 2006; метилирование гена обнаружено только в опухолевых клетках, при более агрессивном развитии ПКК
<i>DLEC1</i>	Ген, делегированный при раке легких и пищевода (deleted in lung and oophageal cancer 1)	3p21.3	Белок, делегированный при раке легких и пищевода является супрессором опухолевого роста, участвует в подавлении клеточной пролиферации	31%	Zhang Q., 2010; метилирование гена обнаружено только в опухолевых образцах
<i>FBN2</i>	Ген фибриллина-2 (fibrillin 2)	5q23-q31	Фибриллин-2 является компонентом кальций-зависимых микрофибрилл, функция связана с фактором роста TGF-β	34%	Morris M., 2011; метилирование гена обнаружено только в опухолевых образцах
<i>HOXA5</i>	Ген гомеобокса A5 (homeobox A5)	7p15.2	Гомеобоксный белок A5 является транскрипционным фактором, регулирует экспрессию генов, участвующих в морфогенезе и дифференцировке клеток, играет важную роль в развитии опухоли	52%	Yoo K. H., 2010; метилирование гена обнаружено при светлоклеточной ПКК
<i>KLHL35</i>	Ген, кодирующий KELCH-подобный белок 35 (kelch-like 35)	11q13.4	KELCH-подобный белок 35 функционирует как субстрат молекулы Cui3, принимает участие в образовании E3-убиквитин-лигазного комплекса	39%	Morris M., 2011; метилирование гена обнаружено только в опухолевых образцах
<i>OVOL1</i>	Ген, кодирующий OVO-подобный белок 1 (OVO-like 1 binding protein)	11q13	OVO-подобный белок 1 является транскрипционным фактором, участвует функционировании мочеполовой системы и процессах сперматогенеза	33%	Rickelts C.J., 2012; метилирование гена обнаружено только в опухолевых образцах
<i>PCDH8</i>	ген протокадгерина 8 (protocadherin 8)	13q21.1	Протокадгерин 8 участвует в клеточной адгезии, а также в CDH2 TAOK2/p38 MAPK-сигнальном пути	58%	Morris M., 2011; метилирование гена обнаружено только в опухолевых образцах
<i>PTGS2</i>	Ген простагландин-эндопероксида-синтазы 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2)	1q25.2-q25.3	Простагландин-эндопероксида-синтаза 2 катализирует первые две реакции синтеза простаноидов	92-96%	Costa V., 2007; метилирование гена обнаружено при светлоклеточной и папиллярной ПКК
<i>QPCT</i>	Ген глутаминил-циклотрансферазы (glutaminyl-peptide cyclotransferase)	2p22	Участвует в синтезе пептидов и в процессах протеолиза	19%	Morris M., 2011; метилирование гена обнаружено только в опухолевых образцах

Краткое название гена	Полное название гена	Локализация	Кодируемый белок и его основные функции	Частота метилирования	Ссылка и примечание
<i>RASSF1A</i>	Ген белка, содержащего домен, гомологичный онкогену RAS семейства 1 (Ras association domain family member 1)	3p21.3	Белок, содержащий домен, гомологичный онкогену RAS семейства 1 относится к супрессорам опухолевого роста, регулирует клеточный цикл, апоптоз, участвует в K-RAS сигнальном пути	70–100%	Gonzalvo M., 2004; метилирование гена обнаружено при папиллярной ПКК
<i>SEMA3B</i>	Ген семафорина 3 (semparhin 3B)	3p21.3	Семафорин 3 является супрессором опухолевого роста, ингибирует аксонное удлинение, участвует в апоптозе	56%	Логинов В.И., 2009; метилирование гена обнаружено при светлоклеточной ПКК
<i>SFRP1</i>	Ген, кодирующий секретируемый завитой белок (secreted frizzled-related protein 1)	8p11.21	Белок является антагонистом в передаче сигналов Wnt-путем	34–46%	Morris M., 2010, Awakura Y., 2008; метилирование гена обнаружено при светлоклеточной ПКК
<i>SOCS2</i>	Ген-супрессор цитокинового сигнального пути 2 (suppressor of cytokine signaling-2)	12q	Супрессор цитокинового сигнального пути 2 участвует в убиквитинизации и протеосомной деградации целевых белков	33%	Rickelts C.J., 2012; метилирование гена обнаружено только в опухолевых образцах
<i>SLC34A2</i>	Ген натрий-фосфатного транспортера (solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2)	4p15.2	Натрий-фосфатный транспортер вовлечен в активный мембранный транспорт фосфатов в клетки	34%	Rickelts C.J., 2012; метилирование гена обнаружено только в опухолевых образцах
<i>SST</i>	Ген соматостатина (somatostatin)	3q28	Гормон соматостатин является важным регулятором эндокринной системы, подавляя секрецию гипофизом гормона роста, тиреотропного гормона, гормонов желудочно-кишечного тракта. Влияет на скорость нервных импульсов в центральной нервной системе и распространение нормальных и онкогенных клеток	31%	Christopher J. Rickelts, 2012; метилирование гена обнаружено только в опухолевых образцах
<i>TMPRSS2</i>	Ген трансмембранной протеазы (transmembrane protease, serine 2)	21q22.3	Трансмембранная протеаза вовлечена в процессы канцерогенеза	21%	Rickelts C.J., 2012; метилирование гена обнаружено только в опухолевых образцах
<i>TM6SF1</i>	Ген трансмембранного суперсемейства 6, член 1 (transmembrane 6 superfamily member 1)	15q24–q26	Белок трансмембранного семейства 6, член 1, участвует в росте клеток	34%	Rickelts C.J., 2012; метилирование гена только в опухолевых образцах
<i>TNFRSF10C</i>	Ген предшественника суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10c precursor)	8p22–p21	Предшественник рецепторов фактора некроза опухоли защищает клетки от TRAIL-индуцированного апоптоза	33%	Rickelts C.J., 2012; метилирование гена только в опухолевых образцах
<i>VHL</i>	Ген фон Хиппеля-Линдау (von Hippel-Lindau)	3p25.3	Белок VHL отвечает за распознавание субстрата E3-убиквитин-лигазного комплекса, специфической мишенью которого является транскрипционный фактор HIF	11–20%	Ronald F., 2009; метилирование гена обнаружено при светлоклеточной ПКК
<i>ZSCAN18</i>	Ген, кодирующий белок «цинковых пальцев» и SCAN содержащий домен 18 (zinc finger and SCAN domain containing 18)	19q13.43	Белок «цинковых пальцев» участвует в регуляции транскрипции	32%	Morris M., 2011; метилирование гена обнаружено при светлоклеточной ПКК

Данный ген содержит 3 экзона и кодирует одноименный белок длиной 213 аминокислотных остатков, который образует комплекс с рядом белков, обладающих E3-убиквитин-лигазной активностью. Считается, что потеря функциональной активности гена *VHL* сопровождается внутриклеточной аккумуляцией фактора альфа 1, индуцированного гипоксией (*HIF-1 α*), с последующей активацией ряда генов, ответственных за синтез сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGF) и других факторов роста (фактор роста тромбоцитов (PDGF), трансформирующего фактора роста альфа (TGF- α)), регулирующих процессы ангиогенеза и опухолевой пролиферации. При светлоклеточной карциноме наблюдается инактивация гена *VHL* вследствие соматических мутаций, потери гетерозиготности или aberrантного метилирования. Соматические мутации гена *VHL* обнаруживаются у 50–70 % больных со спорадическими формами светлоклеточной ПКК, при других гистологических вариантах мутаций данного гена не выявляют. По данным Рональда с соавт. (Ronald et al., 2009), частота метилирования промоторной области гена *VHL* при спорадической форме светлоклеточной ПКК составляет 11–20 %. Другой ген, инактивируемый при ПКК соматическими мутациями в 1/3 случаев, это ген *PBRM1*, участвующий в регуляции активности гистонов и хроматина (van Naaften et al., 2009; Varela et al., 2011).

Эпигенетическая инактивация генов-супрессоров опухолевого роста (например, *RASSF1A*) путем метилирования промоторной области CpG-динуклеотидов также вовлечена в патогенез ПКК и является частым событием, при этом мутации в этих генах встречаются редко (Morris et al., 2003). Таким образом, важным подходом для выяснения молекулярного патогенеза ПКК и выявления маркеров риска развития данного заболевания является определение эпигенетической инактивации генов-супрессоров опухолевого роста.

Одним из маркеров ПКК является гиперметилирование гена ломкой гистидиновой триады (*FHIT*) — гена-супрессора опухолевого роста, частота метилирования которого при ПКК составляет 50–60 % (Costa et al., 2007). Данный ген кодирует AP3A-гидролазу, влияющую на интенсивность репликации ДНК. Продукт гена *FHIT* взаимодействует с белком UBC9, участвуя с ним в деградации циклинов клеточного цикла и препятствуя пролиферации. Кроме того, наличие ломкого района делает ген более чувствительным к действию канцерогенов.

Ген *SFRP1*, локализованный в области 8p11.2, является одним из генов-супрессоров опухолевого роста (Caldwell et al., 2004), который экспрессируется в проксимальных извитых почечных канальцах. Белки семейства SFRP представляют собой внеклеточные сигнальные молекулы, являющиеся антагонистами Wnt-сигнального пути, aberrации которых, как известно, играют ключевую роль в развитии рака. В исследованиях Авакура с соавт. (Awakura et al., 2008) было обнаружено метилирование

гена *SFRP1* в 26 из 57 случаев (45,6 %) светлоклеточной ПКК. В работе Моррис с соавт. промоторное метилирование гена *SFRP1* выявлено в 34 % (20/58) спорадических первичных ПКК и не обнаружено в нормальных образцах тканей, прилегающих к опухоли (Morris et al., 2010). Кроме того, в исследованиях Дайла Е. с соавт. (Dahl et al., 2007) было показано, что статус метилирования гена *SFRP1* значительно ассоциирован с экспрессией мРНК ($p = 0,048$), при этом снижение экспрессии *SFRP1* происходило в неметилированных образцах.

Ген *SFRP2*, являющийся негативным модулятором Wnt-сигнального пути, инактивируется при ПКК. Существуют работы, посвященные исследованию данного гена и механизмов его действия, однако его молекулярный сигнальный механизм недостаточно изучен (Kawamoto et al., 2008). С помощью иммуногистохимических методов была исследована экспрессия гена *SFRP2* в 20 образцах ПКК пациентов с первой стадией заболевания и соответствующих им образцах неизменной почечной паренхимы. Выявлено, что ген *SFRP2* часто инактивировался в опухолевой ткани, причем в большинстве случаев за счет метилирования промоторной области. Также известно, что aberrантное метилирование и гистоновые модификации совместно участвуют в подавлении экспрессии гена *SFRP2* в клетках ПКК.

В работе Кристоф с соавт. было исследовано нарушение метилирования в гене белка p53 для определения агрессивности опухолевых заболеваний. Высокая степень гиперметилирования промоторных регионов наблюдалась в генах фактора активации протеазы апоптоза (*APAF-1*) и протеин-киназы-1 (*DAPK-1*) (97 % и 41 % соответственно). Обнаружена корреляция между степенью метилирования *APAF-1* и размером опухоли, а также состоянием лимфоузлов, но ассоциаций между стадией заболевания, степенью дифференцировки первичной опухоли и возрастом пациентов не выявлено. Некоторые исследования показали, что промоторное гиперметилирование генов *APAF-1* и *DAPK-1* является маркером агрессивного течения рака почки и обеспечивает независимую информацию о прогнозе заболевания (Christoph et al., 2006).

В исследовании Ахмад с соавт. (Ahmad et al., 2011) оценивалось промоторное метилирование генов-супрессоров опухолевого роста *APAF-1*, *DAPK-1* и *SPARC* в 196 парных образцах ткани с первичной ПКК и соответствующих им образцах нормальной почечной паренхимы в популяции Северной Индии. Обнаружено, что высокая частота промоторного метилирования генов *DAPK-1*, *APAF-1* и *SPARC* коррелировала с более высокой стадией опухоли ($p < 0,001$). Метилирование промоторных регионов генов *APAF-1* и *SPARC* было ассоциировано с высокой степенью ядерной градации по Фурману ($p < 0,001$ и $p = 0,036$ соответственно).

Ген ингибитора циклин-зависимой киназы *p16INK4a*, известный как *CDKN2*, *MTS1*, *INK4a* и *CDK4I*, играет ключевую роль в контроле клеточного цикла.

Описаны некоторые механизмы, благодаря которым происходит инактивация гена *CDKN2* — это делеции, промоторное метилирование, точковые мутации, мутации сдвига рамки считывания. В исследовании Видауретта с соавт. (Vidaurreta et al., 2008) была определена частота промоторного метилирования данного гена в популяции Испании, которая составила 22,9 % в опухоли почек, а отсутствие белка p16 наблюдалось в 52,9 % случаев. Кавада с соавт. (Kawada et al., 2001) иммуногистохимическим методом обнаружили гиперметилирование промотора гена, кодирующего белок p16 только у 3,3 % больных ПКК в популяции Японии. Исследователи пришли к выводу, что инактивация гена *CDKN2* является редким событием при начальной стадии рака почки у населения Японии. Таким образом, не вызывает сомнений существование выраженных межпопуляционных различий по частотам метилирования генов, что делает необходимым изучение молекулярных механизмов онкологических заболеваний в различных популяциях мира.

Ген, делетированный при раке легких и пищевода (*DLEC1*), расположенный на хромосоме 3p22.3, является одним из важнейших генов-супрессоров опухолевого роста при ПКК. Метилирование *DLEC1* было обнаружено исследователями при всех светлоклеточных карциномах (Zhang et al., 2010). Аномальное метилирование данного гена было обнаружено в 25 из 81 первичной опухоли (31 %), и лишь в 1 из 53 (2 %) нормальных тканей почки. Статус метилирования гена *DLEC1* был в значительной степени ассоциирован с TNM-классификацией и типом почечно-клеточной карциномы. Таким образом, метилирование данного гена при ПКК может служить маркером для ранней диагностики и прогноза развития ПКК.

Существенные различия в уровне метилирования между четырьмя подтипами опухолей почек были найдены в генах кадгерина-1 (*CDH1*), простагландиновой эндопероксид-синтазы 2 (*PTGS2*), гене *RASSF1A* (Costa et al., 2007). Уровень гиперметилирования гена *CDH1* при светлоклеточной ПКК был значительно выше, чем при хромофобной и онкоцитарной карциномах, а степень метилирования гена *PTGS2* при светлоклеточной ПКК была выше, чем при папиллярной карциноме.

По данным различных источников установлено, что именно при папиллярной карциноме частота гиперметилирования гена *RASSF1A* (70–100 %) значительно выше по сравнению со всеми другими ПКК (Gonzalzo et al., 2004), что может служить прогностическим маркером для данного вида опухоли. При папиллярной карциноме уровень метилирования генов *CDH1* и *RASSF1A* отрицательно коррелировал со стадией опухоли ($p=0,031$) и степенью ядерной градации ($p = 0,022$) соответственно. Это говорит о том, что гены *CDH1*, *PTGS2* и *RASSF1A* по-разному метилируются при различных типах ПКК и могут использоваться в качестве перспективных диагностических и прогностических маркеров.

В гене-супрессоре *GJB1*, ответственном за синтез коннексина-32, было обнаружено aberrантное метилирование CpG-островка в первичных опухолях почки, которое сопровождалось подавлением экспрессии данного гена несмотря на отсутствие значительных делеций или мутаций. Возможно, что подавление экспрессии гена *GJB1* является результатом нарушения регуляторных путей, определяющих его транскрипцию. Показано, что коннексин-32 препятствовал образованию метастазов через ингибирование Src-киназ и снижение уровня экспрессии сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и ингибитора плазминогенного активатора (PAI-1).

Существует целый ряд работ, опубликованных Моррис с соавт., посвященных анализу статуса метилирования различных генов при ПКК. Так, в 2008 году исследователями было обнаружено метилирование гена хемокинового лиганда 16 (*CXCL16*) в нормальной почечной паренхиме, прилегающей к опухоли, что могло указывать на наличие областей предопухолевых клеток в непораженной части почки, но в то же время могло быть следствием случайного попадания злокачественных клеток в образцы с нормальной паренхимой. Интересно, что реэкспрессия гена *CXCL16* значительно сокращала образование колоний клеточных линий почки (Morris et al., 2010, 2011). В одной из последних работ Моррис М. с соавт. провели полногеномный анализ метилирования генов при почечно-клеточной карциноме (Morris et al., 2011). Для сравнения степени метилирования промоторных участков различных генов и выявления инактивированных генов использовалась методика иммунопреципитации метилированной ДНК (MeDIP), которая позволяет выделять фракцию метилированной ДНК из первичной опухолевой ДНК, после чего проводился полногеномный анализ в сочетании с анализом экспрессии генов с применением чипов высокой плотности. Из 56 кандидатных генов наиболее часто были метилированы промоторные участки девяти генов — *ATP5G2* (36 %), *PCDH8* (58 %), *CORO6* (22 %), *KLHL35* (39 %), *QPCT* (19 %), *SCUBE3* (19 %), *ZSCAN18* (32 %), *CCDC8* (35 %), *FBN2* (34 %), причем ни в одном из образцов нормальной почечной паренхимы метилирование данных генов не наблюдалось. Эти данные дают основание предполагать, что вышеперечисленные гены являются прогностическими маркерами развития ПКК. Метилирование промоторного региона гена *SCUBE3* было ассоциировано с рецидивом опухоли или со значительным увеличением риска смертности при ПКК.

Сейчас для определения статуса метилирования используют микрочипы, которые позволяют легко и быстро анализировать сотни генов и их метилирование. С помощью данной методики японскими исследователями определено метилирование 1505 специфических CpG-сайтов в 807 генах, выявлены гиперметилированные гены и проанализирована ассоциация между статусом метилирования и клинико-патологическими параметрами светло-

клеточной карциномы (Yoo et al., 2010). Yoo K. H. с соавт. (Yoo et al., 2010) впервые идентифицировали гиперметилирование двух генов при ПКК (*HOXA5* и *MSH2*), при этом статус метилирования гена *HOXA5* коррелировал со степенью ядерной градации по Фурману. Кроме того, в работе изучалась зависимость между уровнем метилирования генов и выживаемостью пациентов с ПКК. Обнаружено, что кривая выживаемости в группе с высоким уровнем метилирования гена *HOXA5* была ниже, чем в группах с низким уровнем. Гиперметилирование двух данных генов при светлоклеточной карциноме может служить основой для патологической оценки и прогноза течения заболевания. Кроме того, в одной из работ было изучено метилирование двух CpG-островков гена семафорина 3 (*SEMA3B*) при светлоклеточной ПКК — промоторного и интронного (Логинов с соавт., 2009). Показано, что частота метилирования промоторного участка составляет 56 % (34/61), а интронного — 35 % (17/48). Также установлена достоверная обратная корреляция между снижением содержания мРНК этого гена и метилированием промоторного CpG-островка при ПКК. Данный результат позволил предположить, что метилирование промоторного CpG-островка участвует в инактивации гена-супрессора *SEMA3B* при ПКК.

В гене цистатина (*CST6*) промоторное метилирование выявлено у 46 % (28/61) больных с начальной стадией ПКК. В нескольких образцах нормальной почечной паренхимы был обнаружен низкий уровень метилирования промотора гена *CST6* (11 %). Частое метилирование при ПКК наблюдалось в генах альфа-1 (XV) цепи коллагена 5 (*COL15A1*), *RPRM* и гремлина 1 (*GREM1*) (53 % (34/65), 44 % (23/52) и 41 % (11/27) соответственно), а также обнаруживалось в нормальных почечных тканях пациентов (30 % (9/30), 18 % (8/44), 24 % (7/29) соответственно) (Morris et al., 2003).

Ген *KRT19* кодирует цитокератин 19, который является элементом цитоскелета и часто экспрессируется при ПКК. В исследованиях Паива с соавт. (Paiva et al., 2010) проводилась оценка эпигенетической регуляции гена *KRT19* с помощью изучения статуса метилирования его промоторного региона и экспрессии. Данная работа проводилась с использованием эпигенетических моделирующих лекарственных препаратов на 6 клеточных линиях ПКК и в 112 первичных опухолях ПКК (52 светлоклеточных, 22 папиллярных, 22 хромофобных, 16 онкоцитарных случаев ПКК). В клеточных линиях 769-P, A498, Saki-1 реэкспрессия *KRT19* наблюдалась после обработки 5-аза2'-деоксицитидином и трихостатином А, тогда как частота промоторного метилирования оказалась низкой (20,5 % случаев). Показано, что метилирование гена *KRT19* не является частым событием при первичных ПКК и не коррелирует с клинико-патологическими параметрами опухоли.

Ген *UNC5C*, относящийся к одному из семейств нетрин-1 рецепторов, часто инактивируется в клеточных линиях ПКК и при начальной стадии опухоли. Известно,

что белок *UNC5C* экспрессируется в проксимальных извитых канальцах почек человека. В работах Дуна с соавт. (Dun et al., 2011), показано, что инактивация гена *UNC5C* происходит на ранней стадии ПКК в 94,3 % случаев. Метилспецифическая ПЦР показала, что промоторный участок гена *UNC5C* метилировался в двух почечно-клеточных линиях. Фармакологическое деметилирование вызывало экспрессию белка данного гена. Кроме того, бисульфитным секвенированием было подтверждено, что наиболее плотное метилирование наблюдалось в промоторном участке гена *UNC5C* в 12 из 44 парных образцов ПКК (27,3 %). Таким образом, метилирование гена *UNC5C* способствует инактивации одноименного белка при почечно-клеточной карциноме.

В одной из работ (Гранов с соавт., 2008) был проанализирован статус метилирования 5'-фланкирующей области гена семейства биспецифических протеино-вых фосфатаз *DUSP9* в 27 парных образцах опухолевой и прилежащей условно нормальной ткани почки с использованием метода амплификации бисульфит-модифицированной ДНК с последующей рестрикцией (COBRA). Увеличение степени метилирования 5'-фланкирующей области данного гена в опухолевой ткани по сравнению с нормальной паренхимой почки было выявлено у 5 из 9 женщин (56 %), в то время как у 18 мужчин метилированные аллели не были обнаружены ни в нормальной, ни в опухолевой ткани почки, что, возможно, свидетельствует о вовлечении эпигенетической модификации в инактивацию гена *DUSP9* при опухолях почки и указывает на существование различных механизмов, контролирующих транскрипционную активность данного гена в почечной паренхиме (Гранов с соавт., 2008).

В недавней работе Риккетс с соавт. для идентификации новых генов супрессоров опухолей был проведен полногеномный анализ профилей метилирования при ПКК с использованием микрочипов. Исследователи оценили метилирование более 14 тысяч генов и выявили 220 гиперметилированных проб, представленных 205 локусами/генами. В результате анализа была выявлена группа генов-супрессоров опухолевого роста, промоторное метилирование которых было ассоциировано с подавлением транскрипции и ее реактивацией после деметилирования в клеточных линиях ПКК и снижением уровня экспрессии в опухолях. В данную группу вошли следующие гены: *SLC34 A2*, специфически метилированный в 63 % ПКК, *OVOL1* — в 40 %, *DLEC1* — в 20 %, *TMPRSS2* — в 26 %, *SST* — в 31 % и *BMP4* — в 35 %, причем как для гена *OVOL1*, регулятора с-Мус транскрипции, так и гена соматостатина (*SST*) ассоциации с онкологическими заболеваниями ранее показано не было (Ricketts et al., 2012).

Таким образом, в настоящее время идет процесс накопления сведений о генах, специфически метилированных при ПКК в различных популяциях мира. Необходимо

отметить, что до сих пор не существует прогностической интегрированной системы или молекулярных маркеров, рекомендованных для рутинного клинического использования, и актуальной является разработка единой системы диагностических и прогностических критериев при ПКК и других онкологических заболеваниях. Анализ нарушений метилирования ДНК и систематизация полученных данных могут стать основой для формирования научно-обоснованной эффективной системы, позволяющей разработать подходы к коррекции эпигенетических нарушений и создать новую стратегию в противоопухолевой терапии.

РОЛЬ ИНГИБИТОРОВ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ, ГИСТОНОВЫХ ДЕАЦЕТИЛАЗ В ТЕРАПИИ РАКА ПОЧКИ

Нарушение метилирования происходит на ранних стадиях опухоли, и, в отличие от мутаций, которые являются необратимыми, метилирование ДНК можно стабилизировать. Это открывает новые возможности для ранней диагностики и лечения онкологических заболеваний. В последние годы появился целый ряд подходов, позволяющих деметилировать ДНК при раке, тем самым восстанавливая экспрессию генов. Это, к примеру, использование ингибиторов ДНК-метилтрансфераз (DNMT) (Stresemann et al., 2006) — аналогов нуклеозидов. На сегодняшний день наиболее изучены цитидиновые аналоги: 5-азацитидин (Vidaza®), 5-аза-2'-дезоксцитидин (Dacogen®), которые токсичны и обладают множеством побочных эффектов, но, тем не менее, разрешены при лечении некоторых онкологических заболеваний (Raj et al., 2006; Poke et al., 2010). Так, использование различных доз 5-аза-2'-дезоксцитидина позволило деметилировать и восстановить экспрессию упомянутого выше гена *DLEC1* у больных почечно-клеточной карциномой (Zhang et al., 2010).

Второй класс ингибиторов представляют антисмысловые олигонуклеотиды, адресованные к мРНК *Dnmt1* и *Dnmt3a*, которые способны останавливать рост опухолевых клеток (Евдокимов, 2009). Снижение функциональности ДНК-метилтрансфераз внутри клетки, а также неспособность ферментов метилировать ДНК, содержащую 5-азацитидин, приводит к пассивному уменьшению метилирования ДНК после ее репликации. В качестве деметилирующих агентов изучался ряд других цитидиновых аналогов, таких как 5,6-дигидро-5-азацитидин, 5-фтор-2'-дезоксцитидин и зебуларин (Cheng et al., 2003). Молекулы этих веществ химически более стабильны, чем молекулы 5-азацитидина и 5-аза-2'-дезоксцитидина и имеют тот же эффект включения в ДНК и ковалентного связывания с ДНК-метилтрансферазами (Zhou et al., 2002), правда более слабый. В настоящее время данные ингибиторы не используются в лечении рака почки и требуют дальнейшего изучения.

Доказано, что генистеин и 5-аза-2'-дезоксцитидин снижают активность ДНК-метилтрансферазы и усиливают активность гистонацетилазы. Генистеин (Genistein) является одним из самых нетоксичных препаратов, эффективно замедляющим рост клеток ПКК, что играет важную роль в лечении данного заболевания (Majid et al., 2009).

Модификации гистонов также динамичны и могут представлять собой мишени для медикаментозной терапии. Например, ингибиторы моноаминоксидаз (MAO) являются ингибиторами H3K4 деметилазы LSD1: лечение паргилином, транлципромином или клоргилином приводит к гиперметилированию глобулярного гистона H3K4 и подавляет рост нейробластов (Schulte et al., 2009). Ингибиторы гистоновых деацетилаз, такие как вальпроат натрия, уже давно применяются в качестве противоэпилептических препаратов, а также протестированы при ВИЧ и нейродегенеративных заболеваниях, продемонстрировав мощный противоопухолевый эффект в системах *in vivo* и *in vitro*. Вориностат и ромидепсин были одобрены в США, но только для лечения кожной Т-клеточной лимфомы, поскольку не прошли II стадию клинических испытаний среди больных острой миелоидной лейкемией, раком молочной железы, толстой кишки, легких и яичников. В настоящее время ведутся работы по разработке препаратов для селективного воздействия на гистоновые метилтрансферазы или деметилазы, но такие препараты еще не дошли до стадии клинических испытаний (Larkin et al., 2012).

Так, возможность исследования эпигенетических нарушений на уровне конкретных генов открывает широкие перспективы создания новых противоопухолевых препаратов. Правильный терапевтический подход даст возможность снизить дозу препаратов и, соответственно, сократить побочные эффекты от их использования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на существенный прогресс в изучении роли генетических факторов в развитии онкологических заболеваний в целом и почечно-клеточных карцином в частности, остается еще много нерешенных вопросов. Многими исследователями доказано, что эпигенетическая регуляция является одним из ключевых механизмов, вовлеченных в патогенез онкологических заболеваний, и роль метилирования ДНК в возникновении различных карцином, несомненно, велика. И, хотя изучение метилирования ДНК при онкологических заболеваниях начато сравнительно недавно, уже накоплено большое число сведений о спектре метилированных генов при различных онкологических заболеваниях и для ряда из них установлены некоторые прогностические маркеры. Появление новых возможностей молекулярно-генетического анализа генома человека поможет выявить новые диа-

гностические ДНК-маркеры, которые позволяют прогнозировать возникновение и тяжесть течения многих онкологических заболеваний. В настоящее время наиболее перспективными являются комплексные проекты, направленные на полногеномное исследование эпигенетических факторов в развитии онкологических заболеваний (epigenome-wide association studies (EWAS)), которые представляют значительный интерес как для исследователей, так и для клиницистов. Необходимость такого рода исследований продиктована тем, что мутации в генах-супрессорах опухолевого роста выявляются менее чем в 10 % образцов опухолей, т.к. большое число генов часто инактивированы метилированием промоторов. EWAS позволяют проанализировать различные эпигенетические факторы, в том числе метилирование ДНК в злокачественных, доброкачественных и нормальных образцах тканей и выявить метилированные гены, ассоциированные с развитием заболевания у огромного числа индивидов, что, как предполагают, даст возможность разработать молекулярные маркеры ранней диагностики онкологических заболеваний и создать микрочипы для анализа степени метилирования нескольких генов, наиболее важных при том или ином виде рака для рутинного клинического использования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гранов А.М., Якубович Е.И., Лавникович Д.М. и др., 2008. Гендерные различия в метилировании 5'-фланкирующей области гена *DUSP9* у больных со светлоклеточной карциномой почки // Мед. академ. журнал. Т. 8. № 3. С. 55–61.
2. Евдокимов А.А., Зиновьев В.В., Кузнецов В.В. и др., 2009. Конструирование олигонуклеотидных ингибиторов ДНК-метилтрансферазы I человека // Молекулярная биология. Т. 43, № 3. С. 455–463
3. Курынин Р.В., Михайленко Д.С., Залетаев Д.В. и др., 2008. Молекулярные маркеры в диагностике и лечении рака почки // Молекулярная медицина. № 4. С. 24–28.
4. Лебедев И.Н., Саженова Е.А., 2008. Эпимутации импринтированных генов в геноме человека: классификация, причины возникновения, связь с наследственной патологией // Генетика. Т. 44. № 10. С. 1356–1373.
5. Лихтенштейн А.В., Киселева Н.П., 2001. Метилирование ДНК и канцерогенез // Биохимия. № 66. С. 293–317.
6. Логинов В.И., Ходырев Д.С., Пронина И.В. и др., 2009. Два CpG-островка гена *SEMA3B*: метилирование при светлоклеточном раке почки // Молекулярная биология. № 6. С. 1088–1092.
7. Михайленко Д.С., Немцова М.В., 2007. Молекулярно-генетические маркеры рака почки // Российский онкологический журнал. № 4. С. 48–51.
8. Назаренко С.А., 2002. Эпигенетическая регуляция активности генов и ее эволюция // Эволюционная биология. Материалы II Международной конференции «Проблема вида и видообразование». Томск: Томский государственный университет. Т. 2. С. 412.
9. Пальцев М.А., Залетаев Д.В., 2009. Системы генетических и эпигенетических маркеров в диагностике онкологических заболеваний. М.: Медицина. С. 384.
10. Смирнихина С.А., Лавров А.В., 2009. Методы оценки метилирования остатков цитозина в ДНК // Молекулярная биология. Т. 43. № 3. С. 474–479.
11. Стрельников В.В., Кузнецова Е.Б., Танас А.А., 2010. Методы анализа метилирования ДНК // Введение в молекулярную диагностику / под ред. М.А. Пальцева. Москва, ОАО Издательство «Медицина». С. 368.
12. Ahmad S. T., Arjumand W., Seth A., Saini A. K. et al., 2011. Methylation of the APAF-1 and DAPK-1 promoter region correlates with progression of renal cell carcinoma in North Indian population // Tumour Biol. (Epub ahead of print)
13. Aravin A., Sachidanandam R., Bouc'his D. et al., 2008. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice // Mol. Cell. Vol. 31. P. 785–799.
14. Arita K., Ariyoshi M., Tochio H. et al., 2008. Recognition of hemi-methylated DNA by the SRA protein UHRF1 by a base-flipping mechanism // Nature. Vol. 455. P. 818–821.
15. Awakura Y., Nakamura E., Kamoto T. et al., 2008. Methylation-associated silencing of SFRP1 in renal cell carcinoma // Oncology Reports. Vol. 20. P. 1257–1263.
16. Bannister A.J., Schneider R., Myers F.A. et al., 2005. Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes // J. Biol. Chem. Vol. 280. P. 17732–17736.
17. Bannister A.J., Schneider R., Kouzarides T., 2010. Histone methylation: dynamic or static? // Nat. Rev. Cancer. Vol. 10(7). P.457–469.
18. Bártoová E., Krejčí J., Harnicarová A. et al., 2008. Histone modifications and nuclear architecture: a review // J. Histochem. Cytochem. Vol. 56 (8). P. 711–21.
19. Bouzinba-Segard H., Guais A., Francastel C., 2006. Accumulation of small murine minor satellite transcripts leads to impaired centromeric architecture and function // Proc Natl Acad Sci USA. Vol. 103. P. 8709–8714.
20. Caldwell G., Jones C., Gensberg K. et al., 2004. The Wnt antagonist sFRP1 in colorectal tumorigenesis // Cancer Res. Vol. 64. P. 883–888.
21. Cheng J.C., Matsen F.A., Gonzales F.A. et al., 2003. Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine // J. Natl. Cancer Inst. Vol. 95. P. 399–409.
22. Cheung H., Lee T., Rennert O. et al., 2009. DNA methylation of cancer genome // Birth Defects Research (Part C). Vol. 87. P. 335–350.

23. Chi P., Allis C.D., Wang G.G. 2010. Covalent histone modifications — miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers // *Nat Rev Cancer*. Vol. 10. P. 457–469.
24. Christoph F., Weikert St., Kempkensteffen C. et al., 2006. Promoter hypermethylation profile of kidney cancer with new proapoptotic p53 target genes and clinical implications // *Clin. Cancer Res*. Vol. 12
25. Costa V., Henrique R., Ribeiro F. et al., 2007. Quantitative promoter methylation analysis of multiple cancer-related genes in renal cell tumors // *BMC Cancer*. Vol. 7. P. 133.
26. Dahl E., Wiesmann F., Woenekhaus M. et al., 2007. Frequent loss of SFRP1 expression in multiple human solid tumours: association with aberrant promoter methylation in renal cell carcinoma // *Oncogene*. Vol. 26. P. 5680–5690.
27. Dalgliesh G.L., Furge K., Greenman C. et al., 2010. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes // *Nature*. Vol. 4639. P. 360–363.
28. Di Lorenzo A., Bedford M.T., 2011. Histone arginine methylation // *FEBS Lett*. Vol. 585 (13). P. 2024–2031.
29. Duns G., van den Berg E., van Duivenbode I. et al., 2010. Histone methyltransferase gene SETD2 is a novel tumor suppressor gene in clear cell renal cell carcinoma // *Cancer Res*. Vol. 70. P. 4287–4291.
30. El-Osta A., 2003. DNMT cooperativity — the developing links between methylation, chromatin structure and cancer // *Bioessays*. Vol. 25. P. 1071–1084.
31. Esteve P., Chin H., Pradhan S., 2005. Human maintenance DNA (cytosine-5)-methyltransferase and p53 modulate expression of p53-repressed promoters. // *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 102. P. 1000–1005.
32. Fabbri M., Garzon R., Cimmino A. et al., 2007. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B // *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 104. P. 15805–15810.
33. Fan T., Schmidtmann A., Xi S. et al., 2008. DNA hypomethylation caused by Lsh deletion promotes erythroleukemia development // *Epigenetics*. Vol. 3. P. 134–142.
34. Foltz G., Ryu G., Yoon J. et al., 2006. Genome-wide analysis of epigenetic silencing identifies BEX1 and BEX2 as candidate tumor suppressor genes in malignant glioma // *Cancer Res*. Vol. 66. P. 6665–6674.
35. Gama-Sosa M.A., Slagel V.A., Trewyn R.W. et al., 1983. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors // *Nucleic. Acids Res*. Vol. 11. P. 6883–6894.
36. Goll M.G., Bestor T.H., 2005 Eukaryotic cytosine methyltransferases // *Ann. Rev. Biochem*. Vol. 74. P. 481–514.
37. Gonzalgo M., Yegnasubramanian S., Yan G. et al., 2004. Molecular profiling and classification of sporadic renal cell carcinoma by quantitative methylation analysis // *Clin. Cancer Res*. Vol. 10. P. 7276–7283.
38. Gowher H., Liebert K., Herman A., Xu G., 2005. Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA- (cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L // *J. Biol. Chem*. Vol. 280. P. 13341–13348.
39. Huang J., Dorsey J., Chuikov S. et al., 2010. G9a and Glp methylate lysine 373 in the tumor suppressor p53 // *J. Biol. Chem*. Vol. 285. P. 9636–9641.
40. Ito Y., Koessler T., Ibrahim A.E. et al., 2008. Somatic acquired hypomethylation of IGF2 in breast and colorectal cancer. // *Hum. Mol. Genet*. Vol. 17. P. 2633–2643.
41. Jemal A., Bray F., Center M.M., Ferlay J. et al., 2011. Global cancer statistics. // *CA Cancer J. Clin*. Vol. 61(2). P. 69–90.
42. Kato K., Maesawa C., Itabashi T. et al., 2009. DNA hypomethylation at the CpG island is involved in aberrant expression of the L1 cell adhesion molecule gene in colorectal cancer // *Int. J. Oncol*. Vol. 35. P. 467–476.
43. Kawada Y., Nakamura M., Ishida E. et al., 2001. Aberrations of the p14 (ARF) and p16 (INK4a) genes in renal cell carcinomas // *J. J. Cancer Res*. Vol. 92. P. 1293–1299.
44. Kawamoto K., Hirata H., Kikuno N. et al., 2008. DNA methylation and histone modifications cause silencing of Wnt antagonist gene in human renal cell carcinoma cell lines // *Int. J. Cancer*. Vol. 123. P. 535–542.
45. Kim J.K., Samaranayake M., Pradhan S., 2009. Epigenetic mechanisms in mammals // *Cell Mol. Life Sci*. Vol. 66. P. 596–612.
46. Klose R.J., Zhang Y., 2007. Regulation of histone methylation by demethylimination and demethylation. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. Vol. 8 (4). P. 307–318.
47. Kondo M., Suzuki H., Ueda R. et al., 1995. Frequent loss of imprinting of the H19 gene is often associated with its overexpression in human lung cancers // *Oncogene*. Vol. 10. P. 1193–1198.
48. Kurdistani S.K., 2011 Histone modifications in cancer biology and prognosis. *Prog. Drug Res*. 67. P. 91–106.
49. Larkin J., Goh X.Y., Vetter M. et al., 2012. Epigenetic regulation in RCC: opportunities for therapeutic intervention? // *Nat. Rev. Urol*. Vol. 9 (3). P. 147–155.
50. Lim J., Kim S., Gabrielson E., Park Y.B. et al., 2005. Activation of human cancer / testis antigen gene, XAGE-1, in tumor cells is correlated with CpG island hypomethylation // *Int. J. Cancer*. Vol. 116. P. 200–206.
51. Lujambio A., Calin G., Villanueva A. et al., 2008. A microRNA-DNA methylation signature for human cancer metastasis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 105. P. 13556–13561.
52. Majid Sh., Dar A.A., Ahmad A.E. et al., 2009. BTG3 tumor suppressor gene promoter demethylation, histone modification and cell cycle arrest by genistein in renal cancer // *Carcinogenesis*. Vol. 4. P. 662–670.
53. Martin C., Zhang Y., 2005. The diverse functions of histone lysine methylation // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. Vol. 6 (11). P. 838–849.
54. Martinez-Garcia E., Licht J.D., 2010. Dereglulation of H3K27 methylation in cancer // *Nat. Genet*. Vol. 42. P. 100–101.

55. Moore L.E., Pfeiffer R.M., Poscablo C. et al., 2008. Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case-control study // *Lancet Oncol.* Vol. 9. P. 359–366.
56. Morris M.R., Hesson L., Wagner K. et al., 2003. Multi-gene methylation analysis of Wilms' tumour and adult renal cell carcinoma // *Oncogene.* Vol. 22. P. 6794–6801.
57. Morris M.R., Ricketts C., Gentle D. et al., 2010. Identification of candidate tumour suppressor genes frequently methylated in renal cell carcinoma // *Oncogene.* Vol. 29. P. 2104–2117.
58. Morris M.R., Ricketts C.J., Gentle D. et al., 2011. Genome-wide methylation analysis identifies epigenetically inactivated candidate tumour suppressor genes in renal cell carcinoma // *Oncogene.* Vol. 30. P. 1390–1401.
59. Nakagawa T., Kanai Y., Ushijima S. et al., 2005. DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions significantly correlates with loss of heterozygosity on chromosome 9 in urothelial carcinomas // *J. Urol.* Vol. 173. P. 243–246.
60. Nonomura N., Nishimura K., Tsuneharu M. et al., 1997. Loss of imprinting of the insulin-like growth factor II gene in renal cell carcinoma // *Cancer Res.* Vol. 57. P. 2575–2577.
61. Ongenaert M., Van Neste L., De Mey et al., 2008. PubMeth: a cancer methylation database combining text-mining and expert annotation // *Nucleic Acids Res.* Vol. 36. P. 842–846.
62. Paiva F., Duarte-Pereira S., Costa V.L. et al., 2010. Functional and epigenetic characterization of the KRT19 gene in renal cell neoplasms // *DNA Cell Biol.* Vol. 30. P. 85–90.
63. Park P.J., 2009. ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology // *Nat. Rev. Genet.* Vol. 10. P. 669–80.
64. Poke F.S., Qadi A., Holloway A., 2010. Reversing aberrant methylation patterns in cancer // *Current Medicinal Chemistry.* Vol. 17. P. 1246–1254.
65. Raj K., Mufti G.J., 2006. Azacytidine (Vidaza (®)) in the treatment of myelodysplastic syndromes // *Ther. Clin. Risk Manag.* Vol. 2. P. 377–388.
66. Ramsahoye B., Biniszkievicz D., Lyko F. et al., 2000. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 97. P. 5237–5242.
67. Reik W., Walter J., 2001. Genomic imprinting: parental influence on the genome // *Nat. Rev. Genet.* Vol. 2. P. 21–32.
68. Ricketts C.J., Morris M.R., Gentle D., 2012. Genome-wide CpG island methylation analysis implicates novel genes in the pathogenesis of renal cell carcinoma // *Epigenetics.* Vol. 7. P. 278–90.
69. Robertson K., Ait-Si-Ali S., Yokochi T. et al., 2000. DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters // *Nat. Genet.* 2000. Vol. 25. P. 338–342.
70. Roman-Gomez J., Jimenez-Velasco A., Agirre X. et al., 2005. Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/anti-sense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia // *J. Clin. Oncol.* Vol. 23. P. 7043–7049.
71. Ronald F., Morris M., Gentle D. et al., 2009. CpG methylation profiling in VHL related and VHL unrelated renal cell carcinoma // *Molecular cancer.* Vol. 8. P. 31.
72. Ruthenburg A.J., Li H., Patel D.J. et al., 2007. Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Vol. 12. P. 983–994.
73. Saxonov S., Berg P., Brutlag D., 2006. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 103. P. 1412–1417.
74. Scelfo R.A., Schwienbacher C., Veronese A. et al., 2002. Loss of methylation at chromosome 11p15.5 is common in human adult tumors // *Oncogene.* Vol. 21. P. 2564–2572.
75. Schulte J., Lim S., Scramm A. et al., 2009. Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy // *Cancer Res.* Vol. 69. P. 2065–2071.
76. Sims R.J. 3rd, Nishioka K., Reinberg D., 2003. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function // *Trends Genet.* Vol. 19. P. 629–639.
77. Stephens K.E., Miaskowski C.A., Levine J.D. et al., 2012. Epigenetic Regulation and Measurement of Epigenetic Changes // *Biol. Res. Nurs.*
78. Stresemann C., Brueckner B., Musch T. et al., 2006. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines // *Cancer Res.* Vol. 66. P. 2794–2800.
79. Suzuki K., Suzuki I., Leodolter A. et al., 2006. Global DNA demethylation in gastrointestinal cancer is age dependent and precedes genomic damage // *Cancer Cell.* Vol. 9. P. 199–207.
80. Takai D., Gonzales F.A., Tsai Y.C. et al., 2001. Large scale mapping of methylcytosines in CTCF-binding sites in the human H19 promoter and aberrant hypomethylation in human bladder cancer // *Hum. Mol. Genet.* Vol. 10. P. 2619–2626.
81. Tang S.H., Yang D.H., Huang W. et al., 2006. Hypomethylated P4 promoter induces expression of the insulin-like growth factor-II gene in hepatocellular carcinoma in a Chinese population // *Clin. Cancer Res.* Vol. 12. P. 4171–4177.
82. VanHaaften G., Dalgliesh G.L., Davies H. et al., 2009. Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer // *Nat. Genet.* Vol. 41. P. 521–523.

83. Varela I., Tarpey P., Raine K. et al., 2011. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma // *Nature*. Vol. 469. P. 539–542.
84. Vidaurreta M., Maestro M., Sanz-Casla M. et al., 2008. Inactivation of p16 by CpG hypermethylation in renal cell carcinoma // *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. Vol. 26. P. 239–245.
85. Wang Q., Williamson M., Bott S. et al., 2007. Hypomethylation of WNT5A, CRIP1 and S100P in prostate cancer // *Oncogene*. 2007. Vol. 26. P. 6560–6565.
86. Yamada Y., Jackson-Grusby L., Linhart H. et al., 2005. Opposing effects of DNA hypomethylation on intestinal and liver carcinogenesis // *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 102. P. 13580–13585.
87. Yanagawa N., Tamura G., Honda T., et al., 2004. Demethylation of the synuclein gamma gene CpG island in primary gastric cancers and gastric cancer cell lines // *Clin. Cancer Res*. 2004. Vol. 10. P. 2447–2451.
88. Yehezkel S., Segev Y., Viegas-Pequignot E. et al., 2008. Hypomethylation of subtelomeric regions in ICF syndrome is associated with abnormally short telomeres and enhanced transcription from telomeric regions // *Hum. Mol. Genet*. Vol. 17. P. 2776–2789.
89. Yoo K.H., Park Y.K., Kim H.S. et al., 2010. Epigenetic inactivation of HOXA5 and MSH2 gene in clear cell renal cell carcinoma // *Pathology International*. Vol. 60. P. 661–666.
90. Zhang Q., Ying J., Li J. et al., 2010. Aberrant promoter methylation of DLEC1, a critical 3p22 tumor suppressor for renal cell carcinoma, is associated with more advanced tumor stage // *The J. of Urology*. Vol. 184. P. 731–737.
91. Zhao W., Liu H., Liu W. et al., 2006. Abnormal activation of the synuclein-gamma gene in hepatocellular carcinomas by epigenetic alteration // *Int. J. Oncol*. Vol. 28. P. 1081–1088.
92. Zhou L., Cheng X., Connolly B.A. et al., 2002. Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. // *J. Mol. Biol*. Vol. 321. P. 591–599.
93. Zhu H., Geiman T.M., Xi S., Schmidtman A. et al., 2006. Lsh is involved in de novo methylation of DNA. // *EMBO J*. Vol. 25. P. 335–345.

THE ROLE OF HISTONE MODIFICATIONS AND DNA METHYLATION IN RENAL CELL CARCINOMA DEVELOPMENT

Kutlyeva L.R., Gilyazova I.R., Khusainova R.I., Khusnutdinova E.K.

✿ **SUMMARY:** Epigenetic mechanisms of gene regulation play a key role in carcinogenesis. This review will focus on the recent advances of epigenetic investigations in the development of human cancer. The role of histone modifications, genomic imprinting and DNA methylation in renal cell carcinoma development and progression will be considered.

✿ **KEY WORDS:** DNA methylation; histone modifications; kidney cancer; epigenetic factors; tumour suppressor genes.

✿ Информация об авторах

Кутлыева Л. Р. — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН. 450054, г. Уфа. E-mail: mingazovaliliya@mail.ru.

Гилязова И. Р. — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН. 450054, г. Уфа. E-mail: gilyazova_irina@mail.ru.

Хусайнова Р. И. — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН. 450054, г. Уфа. E-mail: ritakh@mail.ru.

Хуснутдинова Э. К. — Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН. 450054, г. Уфа. E-mail: elzakh@rambler.ru.

Kutlyeva L. R. — Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Science Centre, RAS. 450054, Ufa. E-mail: mingazovaliliya@mail.ru.

Gilyazova I. R. — Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Science Centre. 450054, Ufa, RAS. E-mail: gilyazova_irina@mail.ru.

Khusainova R. I. — Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Science Centre. 450054, Ufa, RAS. E-mail: ritakh@mail.ru.

Khusnutdinova E. K. — Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Science Centre. 450054, Ufa, RAS. E-mail: elzakh@rambler.ru.